

第3章 微生物を培養する

第1節 ウイルス

【目的】 植物ウイルスが宿主植物に全身感染するためには、①侵入した細胞でウイルスゲノムを複製して増殖し、②原形質連絡(plasmodesmata)を介して隣接細胞へ移行、さらに③葉肉細胞から維管束組織に侵入し、葉間移行する必要がある。1.1.～1.4.ではこれらのうち①について調べる。オオムギ葉からプロトプラストを調製し、これに *Brome mosaic virus* (BMV、図 3.1-1A) を接種して、細胞レベルでの BMV 増殖の経時的な変化を Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法によって解析する。また同時に、プロトプラストの培養温度をさまざまに設定してウイルス増殖の最適温度についても調べる。

植物ウイルスが細胞中でどのように増殖するかを調べるためには植物体の多数の細胞に同時にウイルスを接種する必要があるが、これは実際には不可能である。機械的に葉の表面に傷をつけて植物体にウイルスを接種すると、感染はごくわずかの頻度でしか成立せず、しかも様々な時間差をもって増殖を開始したウイルスがさらに細胞間移行を行って新たな増殖サイクルを始めるために、接種後のある時点では様々な増殖過程にあるウイルスが混在することになってしまう。

そこでウイルス増殖を同調化するために、植物体からプロトプラストを単離し、 $10^5 \sim 10^6$ 個のプロトプラストにポリエチレングリコール法によって同時にウイルスを導入して感染を成立させる。

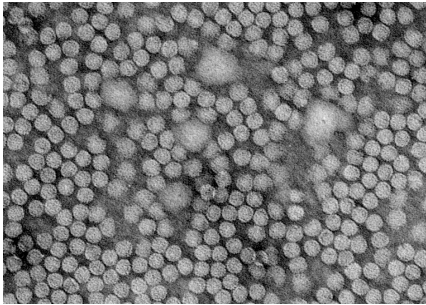


図 3.1-1A BMV の粒子電顕写真

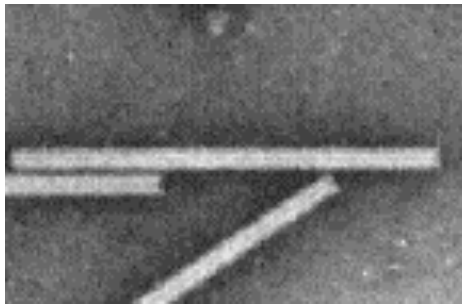


図 3.1-1B PMMoV の粒子電顕写真

1.1 プロトプラストの単離

第4章1節を参照のこと。

1.2 Polyethylene glycol 法によるウイルス接種と、プロトプラストの培養

【注意点】 ウイルスの汚染が広がらないよう細心の注意を払うこと。ウイルスに触れたチューブ類やチップ類は専用のゴミ袋に廃棄すること。プロトプラストは壊れやすいので慎重に取り扱うこと。

【試薬】 0.5 M マンニトール+10 mM CaCl_2 60 ml/班、Polyethylene glycol 溶液 (40% PEG1540+3 mM CaCl_2 , pH 5.5) 1 ml/班、プロトプラスト培養液 (0.2 mM KH_2PO_4 , 1 mM KNO_3 , 1 mM MgSO_4 , 10 mM CaCl_2 , 1 μM KI, 0.01 μM CuSO_4 , 0.5 M マンニトール, pH 6.5) 21 ml/班、BMV 粒子懸濁液(1 mg/ml) 10 μl 、蒸留水 10 μl

【器具】 10 ml ポリプロピレン製遠心チューブ 2 本/班

【器材】 卓上遠心機、人工気象器

- ① 2本の丸底ポリプロピレン製遠心チューブに 1×10^6 個および 2.5×10^5 のオオムギプロトプラストを入れ、遠心分離して沈殿させる。上澄みを $200 \mu\text{l}$ 残すように余分なマンニトールを正確に取り除く。前者のチューブにはウイルス粒子を、後者には水をそれぞれ接種する。
- ② **ウイルス接種** チューブを軽く振って沈殿を再懸濁した後、接種源 (BMV 粒子あるいは蒸留水) $10 \mu\text{l}$ を加え、軽くチューブを振って混ぜ合わせる。次に Polyethylene glycol 溶液を $400 \mu\text{l}$ 加えチューブを回転させて一様に懸濁し、直ちに 0.5 M マンニトール+ 10 mM CaCl_2 液を 4 ml 加えた後、蓋をして全体を混和する。チューブを氷上に 15 分間以上静置する。
- ③ **プロトプラストの洗浄** 遠心分離 (700 rpm , 3 min) でプロトプラストを沈殿させ、上澄みをわずかに残して吸い取り、残った液でプロトプラストを再懸濁する。次に 0.6 M マンニトール+ 10 mM CaCl_2 液をチューブの約 8 分目まで加え、遠心分離 (700 rpm , 3 min) し、プロトプラストを沈殿させる。上澄みを少し残して吸い取り、残った液でプロトプラストを再懸濁する。この洗浄操作をさらにもう一回行う。
- ④ **プロトプラストの培養** ウイルス接種区のプロトプラスト沈殿を 10.5 ml の培養液に懸濁し、 0.5 ml ずつ 20 本のマイクロチューブ (1.5 ml) に分ける。水接種区の沈殿は 2.65 ml の培養液に懸濁し、 0.5 ml ずつ 5 本のチューブに分ける。指定された温度の恒温培養器で 21 時間照射下で培養する。種々の時間に培養器からチューブを取り出して氷上に立て、低温室で保存する。

1.3 ELISA 法によるウイルス増殖量の定量

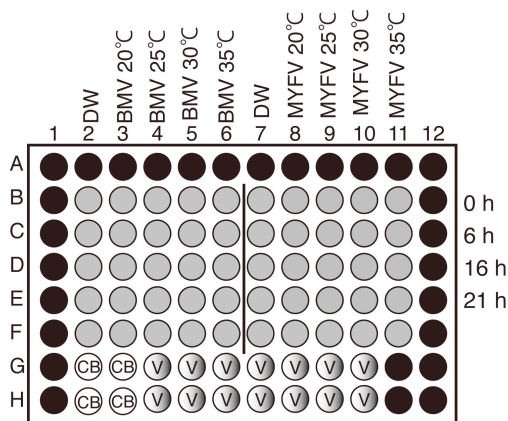
【試薬】 0.05 M 炭酸緩衝液 pH 9.6 ($1.5 \text{ g Na}_2\text{CO}_3 + 2.93 \text{ g NaHCO}_3 / 1$) 20 ml /班、PBST (10 mM リン酸緩衝液 pH7.2, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20) 60 ml /班、抗BMV CP ウサギ抗体 (1×10^4 in PBST) 10 ml /班、アルカリフォスファターゼ結合抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (250 in PBST) 2.5 ml /班 p-ニトロフェニルリン酸 (1 mg/ml) を含む 10% ジエタノールアミン (pH 9.8) 10 ml /班、BMV 粒子懸濁液 (1.0 mg/ml) $10 \mu\text{l}$

【器具】 ELISA プレート 1 枚/班

【器材】

微量高速遠心機、恒温培養器、ボルテックス、マイクロプレートリーダー

- ① チューブを軽くはじき、内壁面に付着しているプロトプラストを浮遊させ、遠心分離 (微量高速遠心機, $6,000 \text{ rpm}$, 1 min) で沈殿させ、ピペットを用いて上清を取り除く。次に沈殿に $200 \mu\text{l}$ の 0.05 M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) を加えた後、ボルテックスで激しく懸濁して破碎し、破碎液 $100 \mu\text{l}$ を ELISA プレートのウェルに分注する。次に段階希釈した既知の濃度の BMV 粒子懸濁液を $100 \mu\text{l}$ ずつ分注する (段階希釈の際にボルテックスでよく混ぜること)。
- ② ELISA プレートをラップで覆い、 37°C で 30 分間静置する。次に $150 \mu\text{l}$ の PBST で 2 回洗浄して、抗 BMV CP ウサギ抗体液を $120 \mu\text{l}$ 分注する。 37°C で 15 分 (以上) 反応させた後、アルカリフォスファターゼ結合抗ウサギ IgG ヤギ抗体液を $30 \mu\text{l}$ 分注する。 37°C で 60 分 (以上) 反応させた後、PBST で 2 回洗浄する。発色液をウェルに $150 \mu\text{l}$ 分注 (泡が立たないように注意する) して 37°C で約 15 分間反応させ、発色させる。マイクロプレートリーダーで 405 nm における吸光度を測定する。



○ CB 炭酸緩衝液 ● ブランク

○ V BMV 粒子 ($10 \mu\text{g/ml} \sim 0.01 \mu\text{g/ml}$)

1.4 実験結果の解析

既知のウイルス粒子濃度に対するマイクロプレートリーダーの吸光度測定値を対数グラフにプロットして疑似直線を描く。このグラフを元にそれぞれのサンプルのウイルス濃度を求め、ウイルスの増殖曲線を描く。